

学校编码: 10384

分类号____密级____

学号:

UDC _____

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

水稻 *TAA1* 同源基因的克隆及其功能鉴定

Cloning and Functional Analysis of Rice *TAA1* Homologous

指导教师姓名:

专 业 名 称: 遗 传 学

论文提交日期: 2011 年 5 月

论文答辩时间: 年 月

学位授予日期: 年 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

2010 年 月

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为()课题(组)的研究成果,获得()课题(组)经费或实验室的资助,在()实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（ ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，
于 年 月 日解密，解密后适用上述授权。

（ ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年 月 日

厦门大学博硕士论文摘要库

目 录

摘要.....	I
Abstract.....	III
第一章 前言	1
1.1 植物的避荫反应	1
1.2 早期对遮荫效应的研究	3
1.3 植物的光感受系统	4
1.4 植物激素	8
1.5 植物生长素	10
1.6 TAA1（拟南芥中的色氨酸转氨酶 1）	15
1.7 实验的目的与意义	17
1.8 实验研究线路	18
第二章 实验材料与方法	19
2.1 实验材料	19
2.2 实验仪器	19
2.3 主要试剂	20
2.4 实验方法	28
第三章 结果与分析	43
3.1 水稻幼苗避荫反应的检测	43
3.2 利用 PCR 技术扩增日本晴 TAA1 同源基因的 cDNA 编码区片段	44
3.3 植物表达载体 pCHF3-OS-YFP 的构建	50
3.4 原核表达载体 pMBP-c-OS 的构建	52
3.5 目的基因片段在大肠杆菌 BL21 的表达	54
3.6 目的蛋白的提取及纯化	55
3.7 目的蛋白的体外酶活检测	56
3.8 目的基因片段在拟南芥 <i>sav3-1</i> 突变体中的表达	60

3.9 转基因植株的表型分析	63
第四章 讨论	68
4.1 水稻幼苗的避荫反应	68
4.2 关于 <i>OS-1</i> 、 <i>OS-2</i> 及 <i>OS-3</i> 在水稻中的表达	68
4.3 关于 PCR 体系	69
4.4 <i>OS-3</i> 表达的光调控分析	69
4.5 <i>OS-1</i> 与 <i>OS-2</i> 的酶活与融合蛋白的表达	70
第五章 总结及展望	71
5.1 总结	71
5.2 后续工作展望	71
参考文献	72
致谢	77

Content

Abstract in Chinese.....	I
Abstract in English.....	III
Chapter1 Introduction.....	1
1.1 Shade-avoidance response of plant.....	1
1.2 Early studies on the effects of shade on plants.....	3
1.3 Photoreceptors of plants.....	4
1.4 Plant hormones and Shade-avoidance response.....	8
1.5 Auxin.....	10
1.6 TAA1.....	15
1.7 Purpose and Significance of Research.....	17
1.8 The route of the experiment.....	18
Chapter2 Materials and methods.....	19
2.1 Experimental material.....	19
2.2 Experimental apparatus.....	19
2.3 Experimental reagent.....	20
2.4 Experimental methods.....	28
Chapter3 Experimental results and Analysis.....	43
3.1 Detection of shade-avoidance response of rice seedlings	43
3.2 Amplification of cDNA coding sequence of TAA1 homologous genes by PCR.....	44
3.3 Construction of plant overexpression vector <i>pCHF3-OS-YFP</i>	50
3.4 Construction of prokaryotic expression vector <i>pMBP-c-OS</i>	52
3.5 Expression of target gene segments in <i>E. coli</i> BL21 strain.....	54
3.6 The extraction and purification of target protein.....	55
3.7 <i>In vitro</i> enzyme activity assay of target protein.....	56
3.8 The expression of target gene segments in <i>Arabidopsis sav3-1</i> mutant...60	
3.9 Phenotypic analysis of transgenic plants	63

Chapter4 Discussion.....	68
4.1 Shade-avoidance response of Rice seedlings.....	68
4.2 Expression in rice of <i>OS-1</i> 、 <i>OS-2</i> 、 <i>OS-3</i>	68
4.3 The system of PCR.....	69
4.4 Analysis of light regulation of <i>OS-3</i> expression.....	69
4.5 Expression of fusion protein.....	70
Chapter5 Conclusion and following job.....	71
5.1 Conclusion.....	71
5.2 following job.....	71
References.....	72
Acknowledgements	77

摘要

避荫反应指喜光植物在被遮荫时所产生的一种植物适应环境的可塑性反应。植物发生避荫反应时会出现垂直茎和叶柄的伸长,以促使叶片更高,使植物更易于接受光照,该反应发生时会出现一系列的形态和生理变化,例如拟南芥在被遮荫时,其下胚轴和叶柄会快速伸长,叶表面积以及叶绿素会减少,叶片角度会发生改变等;还会导致营养组分向快速伸长的器官(如茎和叶柄)转移,减少在其它组织和器官(如叶片,花,果实和储藏器官)的分配。

水稻是重要的粮食作物,高密度种植引起的避荫反应会使大部分的生物量转移至茎等伸长组织,或者株型过高易引起倒伏,从而导致水稻的减产。因此水稻避荫反应的分子机制的研究,可以为水稻株型的改良提供重要的分子依据。

TAA1 (Tryptophan aminotransferase of *arabidopsis* 1, 拟南芥的色氨酸转氨酶1) 是拟南芥中色氨酸依赖型生长素合成途径中的关键酶,研究发现 TAA1 参与调控拟南芥的避荫反应,低 R/FR(红光与远红光的比例)的光照(模拟遮荫)能快速诱导 TAA1 催化色氨酸(Trp)与丙酮酸(PA)生成吲哚丙酮酸(IPA)的反应,进而促使生长素的快速合成,加速拟南芥下胚轴的伸长。为了鉴定水稻中 TAA1 的同源基因是否也参与了水稻的生长素合成及避荫反应。本论文主要做了以下工作:

- 1, 水稻日本晴幼苗在模拟遮荫条件下,与模拟白光下相比,叶鞘明显伸长,验证了水稻存在避荫反应。
- 2, 通过基因及蛋白质序列比对,在水稻基因库中我们选取了三个与 TAA1 有较高同源性的基因: *os01g0717400* (OS-1), *os01g0717700* (OS-2), *os05g0169300* (OS-3); 利用 RT-PCR 及 PCR 技术克隆到这三个基因的 cDNA 编码区片段。
- 3, 将克隆得到的 OS-1、OS-2、OS-3 cDNA 编码区片段分别连入原核表达载体 *pMBP-c*, 并表达于大肠杆菌 BL21 中,体外纯化得到融合蛋白。体外酶活检测发现,OS-3 具有色氨酸转氨酶活性,其最适 PH 值为 8.5,最适反应温度 55℃,并对 Trp、Phe、Lue、Ala、Met、His、Tyr、Cys 有转氨酶活性。

- 4, 将克隆得到的 OS-1、 OS-2、 OS-3 的 cDNA 编码区片段分别连入植物过表达载体 *pCHF3-YFP* 中, 并表达于拟南芥 *TAA1* 突变型植株 *sav3-1* 中, 表型分析发现, 在模拟遮荫条件下, 转基因拟南芥植株 *sav3-1/OS-3* 表现为下胚轴快速伸长, 推测 OS-3 在转基因拟南芥有色氨酸转氨酶活性, 参与了生长素的合成。

综上所述, 本实验发现 OS-3 可能是 TAA1 在水稻体中的具相同功能的同源基因; OS-3 是否参与水稻中生长素的合成及避荫反应正在进一步的探索当中。

关键词: 避荫反应 水稻 TAA1 生长素

Abstract

Shade-avoidance response refers to a plastic adaptation response when shade-avoiding plants are shaded. Under the shade, those plants will rapidly initiate a set of physiological changes such as elongation of vertical stem and petioles to make them more available to sunlight, which are collectively referred to as shade avoidance syndrome. For model organism, *Arabidopsis thaliana*, shade would induce rapid growth of hypocotyls and petiole of seedlings, decrease of Leaf surface area and chlorophyll and changes of blade angle. The main output of the shade avoidance response is re-allocation of energy resources towards elongation growth.

Rice is an important grain crop. Shade-avoidance response will result in reduction in yield of crops that display shade avoidance syndrome when planted at high density. So study on molecular mechanisms of shade-avoidance response in rice can offer us important molecular basis on transformation of plant type.

TAA1 (Tryptophan aminotransferase of arabidopsis 1) is a key enzyme of tryptophan-dependent auxin biosynthesis of *arabidopsis thaliana*. It is also involved in regulating the shade-avoidance response. Low ratio of red and far-red light (R/FR) which simulates shade, can induce the reaction quickly that TAA1 catalyzes tryptophan (Trp) and pyruvic acid (PA) to generate Indole pyruvate (IPA), then cause the rapid synthesis of auxin which accelerates the elongation of hypocotyls. To identify rice homologous genes of *TAA1* that may be involve in auxin biosynthesis and shade-avoidance response, we conducted following studies.

1. We detected leaf sheath of nipponbare seedlings elongated significantly under mock shade, compared with under the mock light. It verified the existence of rice shade avoidance response.
2. By gene and protein sequences comparison, we chose to focus on three genes with high homology to *TAA1*: *os01g0717400* (*OS-1*), *os01g0717700* (*OS-2*), *os05g0169300* (*OS-3*). We obtained their cDNA coding region by RT-PCR.

3. The cloned OS-1、 OS-2、 OS-3 coding region were inserted into the prokaryotic expression vector *pMBP-c*, expressed in *E. coli* BL21 strain and the recombinant proteins were purified . *In vitro* enzyme activity assay indicates that OS-3 has tryptophan aminotransferase activity, with an optimal PH of 8.5, an optimal temperature of 55 °C and the aminotransferase activity of Trp, Phe, Ala, Tyr, His, Leu, Met, Cys.
4. The cloned OS-1, OS-2 and OS-3 coding region were also subcloned into plant overexpression vector *pCHF3-YFP*, and transformed to *TAA1* mutant of Arabidopsis, *sav3-1*.OS-1-YFP, OS-2-YFP and OS-3-YFP were all expressed. After phenotypic analysis, we found OS-3-YFP transgenic plants have elongated hypocotyls in both continuous white light and shade, which suggests that OS-3 may have similar function to TAA1.

Collectively, we think OS-3 may be a functional TAA1 homologous in rice. However, whether OS-3 is engaged in auxin biosynthesis and shade-avoidance response modulation of rice needs further exploration.

Key word: Shade-avoidance; Rice; TAA1; IAA

第一章 前言

1.1 植物的避荫反应

1.1.1 植物对环境的可塑性反应

环境在植物生长过程中发挥了重要作用，植物固着生长，不能像具有神经系统的人那样对环境做出响应，但植物能够改变自身的代谢路径及生长发育模式来响应环境的变化，它们通过改变形态、生理和发育性状，最大限度地达到其表型与生存环境相适应，从而缓冲环境对生长和生殖产生的消极影响，即出现了植物表型的可塑性^[1-3]。

植物可塑性反应指同一基因型植物在不同环境下产生不同表型的反应^[4]。可塑性反应是一系列信号促使的，这些信号有：1，特定的外界信号，如远红光与红光的比例变化；2，植物所需资源数量的变化，如土壤中水或营养元素的改变；3，外界对植物的损伤，如紫外辐射造成的损伤。可塑性反应是植物适应自然界的選擇进化的表现，如避荫反应，向光性反应或是水淹反应。某些性状的可塑性又不能笼统地说它是有利的，如森林中喜光树种在遮荫条件下，一般会伸长茎或枝来尽可能地截获光能以获得更好生长，同时由于资源受限，节间生长可能会降低。植物形态可塑性发生变化的同时植物体内资源分配也发生了改变，如营养组分向快速伸长的器官（如茎和叶柄）转移，减少在其它组织和器官（如叶片，花，果实和储藏器官）的分配。

1.1.2 避荫反应

光作为重要的环境因子，是植物必需的资源之一，对植物的生长发育、生理生化和形态结构等方面有着重要的作用。光不仅可以为植物的光合作用提供能量，而且还参与调控植物的光形态建成，即植物通过植物的光敏色素、隐花色素等光受体感受光质、光量的变化，然后通过信号传导，调控基因的表达，最终导致植物做出改变生物量分配和发生形态变化的可塑性反应^[5]。避荫反应也是光环境因子作用下喜光植物的可塑性反应。

避荫反应（如图 1-1）是喜阳植物响应“光”这一环境信号的减弱，为了最大限度地获得光能而诱导一系列生理变化，并最终改变自身形态的适应机制^[6]。植物在避荫反应中出现的一系列形态及生理变化即为避荫综合症 SAS（shade avoidance syndrome）：其体内的生物量从储能器官分配到快速伸长的茎和叶柄^{[7][8]}，下胚轴和叶柄快速生长^{[9][10][11]}，叶的表面积和叶绿素减少^[12]、改变叶子角度等；但持续遮荫时，避荫植物还会提前进入生殖生长期，以便在阳光被完全遮蔽前完成整个生长周期^[13, 14]。

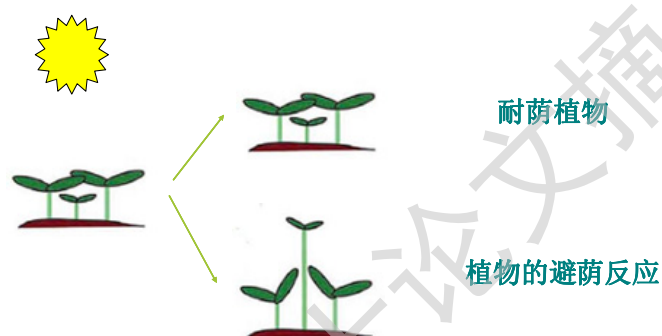


图 1-1：喜光植物的避荫反应

Fig1-1: Shade-avoidance response of shade-avoiding plants

实验证明^[15]，植物叶片中的叶绿素和其它色素能大量吸收包括红光在内的可见光，而对远红光的吸收则较少。植物叶片反射或透射的光与直射光相比，不仅光强较弱，而且红光（R）和远红光（FR）比例也有所降低，即在自然环境中，上层植株的叶片会提供给下层植株一个外界遮荫的信号，以使下层植株产生避荫反应来争夺更多的光源。目前研究的较多的是低 R/FR（红光与远红光的比例）的光照产生的避荫反应，即植物通过光敏色素感受光信号的变化诱导避荫相关基因的表达从而调控植株生长模式的可塑性反应。太阳光中蓝光强度是光强的一个重要指标，研究表明当植物被遮荫时，蓝光的强度会随之降低了，对于多种物种研究发现，蓝光的光强降低也会引起避荫反应^[16, 17]。目前对于它的信号机制我们还不很清楚。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库